

**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
FACULTAD DE VETERINARIA**

**DIAGNÓSTICO DEL VIRUS GAMMAHERPES BOVINO 4 (BoHV – 4) EN RODEOS
LECHEROS PORTADORES DE LA INFECCIÓN NATURAL EN EL
DEPARTAMENTO DE FLORIDA, URUGUAY**

TESIS DE GRADO presentada como uno de los requisitos para obtener el título de Doctor en Ciencias Veterinarias. Orientación: Producción animal e Higiene, Inspección, Ciencia y Tecnología de los Alimentos de origen Animal

MODALIDAD: Estudio de caso

MONTEVIDEO

URUGUAY

2017

PÁGINA DE APROBACIÓN

Tesis de grado aprobada por:

Presidente de mesa:

Dra. Kelly Guedes

Segundo miembro:

Dra. Elena Cardozo

Tercer miembro

Dra. Laureana De Brun

Cuarto miembro

Dr. Rodrigo Puentes

Fecha: 21 de Diciembre de 2017

Autoras:

Cecilia Castro Echeverría

Lucía Rivero Villalba

AGRADECIMIENTOS.

Queremos aprovechar este trabajo final para agradecer a todas las personas que contribuyeron de una forma u otra a culminar esta carrera, sin las cuales hubiera sido imposible de llevar a cabo.

Este trabajo es fruto del esfuerzo y compromiso de un equipo de personas, primero y particularmente agradecer a la Dra. Laureana de Brun por proponernos arrancar con este proyecto, gracias por su paciencia a la hora de transmitir sus conocimientos, por su dedicación y entrega en este proceso y más importante por brindarnos nada más y nada menos que su amistad. Al Dr. Rodrigo Puentes que no dudó en decir que siempre hay algo para hacer, por su apoyo constante, su generosidad, paciencia y dedicación, incentivar el espíritu crítico con nuestro trabajo, por estar siempre “al pie del cañón”, agradecerle que estuvo siempre ultimando detalles y mostrando con sus correcciones que hay que ser exigentes con nosotros mismos. A la Br. Valeria da Silva, futura colega y compañera de proyecto. Gracias a todo el equipo de inmunología, profesores, ayudantes, técnicos y honorarios, a todos, gracias por su compañerismo, por compartir e integrarnos en su trabajo y por hacer de ese espacio un lugar donde pudimos crecer como profesionales y como personas.

Darles las gracias a funcionarios de biblioteca por su dedicación y orientación en la búsqueda bibliográfica y sus correcciones.

Agradecer también a nuestra casa de estudio que nos dio no solo una formación profesional, nos dejó una segunda familia, amigos, compañeros en más de una lucha.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES:

En lo personal quiero agradecerle a mi familia, a mis padres particularmente que me dieron la oportunidad y el apoyo para venir a estudiar y continúan haciéndolo hasta hoy, a mis hermanos, que siempre están, a Martín quien en este último tiempo donde constó mi mayor reto estuvo impulsando y acompañándome para que culmine esta etapa la cual llegó a ser un desafío importante en mi vida, y de una forma muy especial quiero agradecerles a mis abuelos que mientras estuvieron conmigo me apoyaron y hoy desde donde estén me mandan mucha fuerza para seguir porque de ellos llegó a mi esta vocación.

Dar gracias a los amigos, aquellas con las que llegamos a Montevideo para compartir una casa y aprender a sobrevivir solas y juntas, los que conocimos en facultad como compañeros y se quedaron para seguir compartiendo la vida y los otros que cerca o a la distancia siempre estuvieron pendientes, dando una palabra de aliento en los peores momentos y alegrándose por los buenos.

Por último quiero agradecer a Lucía, la gran compañera que me dejó este trabajo, con quien compartimos largas jornadas de laboratorio y drive, y conseguí estrechar una amistad.

Cecilia.

En principio quiero agradecer a mi segunda familia, la que me dejó nuestra casa de estudio y a mis amigos de siempre, mis compañeros en más de una lucha, a la barra que está siempre que me aguanta el corazón y me apoya. A Cecilia que se sumó y se puso la mochila y todo el equipaje de este proyecto al hombro en el momento justo, sin dudas una gran compañera de trabajo y excelente persona con quien compartí más que largas horas de laboratorio.

En lo personal infinitas gracias a toda mi familia, a mis hermanos, tíos, primos, a Oli y a los que ya no están con nosotros pero nos cuidan desde arriba. A cada uno de ellos le doy las gracias por formar parte de mi vida y por contribuir en mayor o menor medida a ser la persona que soy. A Miguel, por estar conmigo en todo momento apoyándome y escuchándome, por su paciencia y por regalarme a mi pedacito de cielo, Emilia que me inspira todos los días.

Finalmente agradezco a mis padres, Stella y Eduardo que me han dado todo, ellos son y serán mi ejemplo de superación, de voluntad y de trabajo. Son los que me enseñaron que con esfuerzo y dedicación puedo llegar a donde me proponga. Gracias.

Lucía.

TABLA DE CONTENIDO

	Páginas
Página de aprobación.....	2
Agradecimientos.....	3
Lista de figuras y tablas.....	7
1. Resumen.....	8
2. Summary.....	9
3. Introducción.....	10
4. Revisión bibliográfica.....	12
4.1. Descripción del agente.....	12
4.2. Replicación y latencia.....	13
4.3. Epidemiología.....	14
4.3.1. Distribución.....	14
4.3.2. Transmisión.....	14
4.3.3. Antecedentes en la región.....	15
4.3.4. Implicancias clínicas del virus.....	15
4.3.5. Virus gammaherpes bovino 4 en el Uruguay.....	16
4.4. Patogenia y manifestaciones clínicas causadas por BoHV - 4.....	16
4.5. Respuesta inmune del hospedador a la infección.....	18
4.6. Diagnóstico.....	18
4.6.1. Detección serológica.....	18
4.6.2. Detección molecular.....	19
4.7. Control.....	19
5. Objetivos.....	20
5.1. Objetivo general.....	20
5.2. Objetivos específicos.....	20
6. Materiales y métodos.....	21

6.1.	Muestras.....	21
6.2.	Detección de anticuerpos anti-BoHV-4.....	21
6.3.	Extracción de ADN y Estandarización de la Nested – PCR.....	23
6.4.	Secuenciación y análisis filogenético.....	23
6.5.	Análisis de los datos.....	24
7.	Resultados.....	25
8.	Discusión.....	28
9.	Conclusiones.....	30
10.	Bibliografía.....	31
11.	Anexo.....	37

LISTA DE FIGURAS Y TABLAS

Figuras

Figura 1.	Estructura del Herpesvirus.....	12
Figura 2.	Organización genómica de BoHV - 4.....	13
Figura 3.	Gel de agarosa de nPCR para revelar la amplificación de BoHV-4...	26
Figura 4.	Análisis filogenético del BoHV – 4.....	27

Tablas

Tabla 1.	Rangos de coeficientes establecidos para los 3 antígenos comparados por el kit de ELISA.....	22
Tabla 2.	Descripción de la reacción de cadena de la Polimerasa (PCR).....	23
Tabla 3.	Cantidad de animales discriminada según los resultados de la técnica serológica utilizada, ELISA	25
Tabla 4.	Relación entre positivos simultáneos a ELISA.....	26

1- RESUMEN

El virus *Gammaherpes bovinus 4* (BoHV – 4) miembro de la familia Herpesviridae, subfamilia *Gammaherpesvirinae*, género *Rhadinovirus* está distribuido mundialmente y se lo ha aislado tanto en animales sanos como enfermos con infecciones respiratorias, vulvovaginitis, mastitis, abortos, endometritis. La infección latente es una estrategia utilizada por este virus, manteniéndose en las células de la línea monocítica y tejidos del sistema nervioso periférico y/o central. Presenta particular afinidad por el endotelio vascular, tejido mamario, endometrio y tejidos fetales. La baja eficiencia reproductiva al igual que el bajo índice de procreo son los problemas primordiales en la ganadería de cría a nivel nacional. Existen varios factores involucrados, pero en lo que se refiere a causas virales, los principales agentes involucrados han sido el virus de la rinotraqueitis infecciosa bovina y el virus de la diarrea viral bovina. Sin embargo hasta el momento no se habían realizado estudios que demostraran la presencia del virus *Gammaherpes* tipo 4 y su impacto en la salud animal. Teniendo en cuenta que otros países de la región han puesto en evidencia la presencia de este virus y su repercusión, se consideró de suma importancia la búsqueda del mismo en el rodeo nacional. Se utilizó un ELISA comercial como técnica serológica para determinar la presencia de anticuerpos específicos y se estandarizó una reacción de la cadena de polimerasa (nPCR) para confirmar la presencia del agente viral, secuenciando posteriormente algunas de las muestras positivas. Se utilizaron 47 muestras de sangre y suero de vacas Holando con antecedentes de problemas reproductivos (repetición de celos, abortos, etc) del departamento de Florida, Uruguay. Mediante este experimento se determinó que 40 (85%) de las muestras analizadas fueron seropositivas para BoHV-4, y 13 (28%) fueron positivas para la nPCR. El árbol filogenético demostró un alto nivel de homología entre las cepas uruguayas y los aislamientos de la región. Este es el primer reporte en nuestro país de la presencia de BoHV-4. Estudios futuros deben ser realizados para evaluar la diseminación del virus en la población bovina y cuál es el impacto que el mismo produce en la producción nacional.

2 – SUMMARY

The bovine *Gammaherpes* virus 4 (BoHV-4) member of the family Herpesviridae, subfamily *Gammaherpesvirinae*, genus *Rhadinovirus* is distributed worldwide and has been isolated in both healthy and diseased animals with respiratory infections, vulvovaginitis, mastitis, abortions and endometritis. Latent infection is a strategy used by this virus, using the cells of the monocytic line and tissues of the peripheral and / or central nervous system. It has a particular affinity for the vascular endothelium, mammary tissue, endometrium and fetal tissues. The low productive efficiency as well as the low index of procreation are the primordial problems in the breeding livestock at national level. There are several factors involved. But as far as viral causes are concerned, the main agents involved have been bovine infectious rhinotracheitis virus and bovine viral diarrhea virus. However, studies to demonstrate the presence of *Gammaherpes* virus type 4 and its impact on animal health have not yet been carried out. Taking into account that other countries in the region have demonstrated the presence of this virus and its impact, it was considered of utmost importance the search for the same in the national rodeo. A commercial ELISA was used as a serological technique to determine the presence of specific antibodies and polymerase chain reaction (nPCR) was standardized to confirm the presence of the viral agent, subsequently sequencing some of the positive samples. 47 samples of blood and sera from Holland cows with a history of reproductive problems (jealousy replication, abortions, etc.) were used in different farms of Florida departments in Uruguay. This experiment determined that 40 (85%) of the analyzed samples were seropositive for BoHV-4, and 13 (28%) were positive for nPCR. Phylogenetic tree demonstrated a high level of homology between Uruguayan strains and insulations from the region. This is the first report in our country of the presence of BoHV-4. Future studies should be carried out to evaluate the dissemination of the virus in the bovine population and which impact produces in the national production.

3 -INTRODUCCIÓN

El agente etiológico (BoHV-4) pertenece al orden *Herpesvirales*, familia *Herpesviridae*, subfamilia *Gammaherpesvirinae*, género *Rhadinovirus*, especie virus gammaherpes bovino 4 (ICTV, 2016).

Antiguamente, mal relacionado genéticamente con otro herpesvirus bovino, BoHV – 1, que pertenece a la subfamilia *Alfaherpesvirinae*, responsable de la rinotraqueítis infecciosa bovina (Davisson y col., 2009).

Más de 40 cepas de BoHV - 4 se han aislado en todo el mundo. Estas cepas se pueden clasificar en tres grupos: cepas europeas (similares a Movar cepas 33/63), cepas americanas (o cepas similares a DN599) y cepas de búfalos africanos (Motta y col., 2013).

Puede infectar a rumiantes como la especie bovina, bisonte americano, búfalos, ovejas y cabras, así también a no rumiantes como conejillos de indias y gatos (al menos los recién nacidos) (Chastant-Maillard, 2013).

Estudios genéticos indican que BoHV - 4 ha sido transmitido de búfalos al ganado en algún momento posterior a la adquisición de genes de BoHV - 4 por parte de los primeros. Esto se desprende de casos donde la transmisión interespecie debe haber ocurrido en el pasado, aunque se detectan una serie de eventos de recombinación genética (Dewals y col., 2006). Además, Dewals y col. (2005) indican como reservorio original de BoHV-4 al búfalo africano, luego de encontrar prevalencias mayores en el búfalo africano que en el ganado.

BoHV-4 presenta una distribución mundial, ha sido aislado de bovinos con infecciones respiratorias, vulvovaginitis, mastitis, abortos, endometritis y de animales aparentemente sanos en diferentes partes del mundo poniendo de manifiesto el riesgo que podría representar para la salud pública. Si bien no se ha reconocido como agente causal de una entidad patológica en particular, se asocia principalmente con infecciones del tracto reproductivo de los bovinos (Morán y col., 2015).

Este virus puede infectar un amplio rango de especies tanto in vivo como in vitro. La infección latente que desarrolla es una herramienta de supervivencia del virus. En algunas ocasiones se ha visto que se establece latencia en células de la línea monocítica, como también en tejidos del sistema nervioso periférico y / o central (Campos y col., 2014).

Según Donofrio y col., (2000), Costa y col., (2011) y Verna y col., (2012), este virus infecta las células mononucleares de la sangre y presenta tropismo específico por

endotelio vascular, tejido mamario, endometrio y tejidos fetales. Puede también encontrarse en hueso o células de la médula ósea a los 62 días post inoculación.

El BoHV-4 cobra cada vez más importancia en los problemas reproductivos debido a que, junto a su capacidad patológica, predispone la aparición de otras enfermedades (Chastant-Maillard, 2013). Su impacto negativo en el rendimiento reproductivo ha sido sugerido por un estudio epidemiológico donde se puede ver que la seroprevalencia contra BoHV - 4 es mayor en hembras abortadas y en los cuadros de repetición de celo respecto a hembras que no presentan problemas reproductivos (Motta y col., 2013).

En cuanto a nuestro país, las pérdidas reproductivas rondan entre 11 y 12 % (Baroni, 2017) siendo el principal problema en la ganadería de cría a nivel nacional, con índices de procreo que rondan el 70,2% (Uruguay XXI, 2015). Considerándose actualmente de importancia en esta casuística a rinotraqueitis viral bovina (BoHV – 1) y diarrea viral bovina (DVB) (Eastman, 2006). Hasta el momento no se han hecho estudios que demuestren la presencia del gammaherpes bovino 4 a nivel nacional y cuál es el impacto que el mismo puede tener en la salud animal.

Como diagnóstico se han utilizado técnicas serológicas como Inmunoensayo ligado a enzima (ELISA), principalmente, para la detección de anticuerpos específicos (Organización Internacional de Salud Animal, 2008). La técnica de reacción de la cadena de polimerasa (PCR) es a su vez una de las más utilizadas para amplificar diferentes regiones del genoma viral (Morán, 2015). Esta técnica ha sido modificada de numerosas maneras según Manual de la OIE (2008). Dentro de estas, una de las más usadas es la PCR anidada (del inglés, Nested PCR) que emplea dos pares de cebadores en dos rondas sucesivas del ensayo, el segundo amplifica una secuencia diana del producto de amplificación de la primera ronda.

En base a lo expuesto consideramos de suma utilidad la detección tanto serológica como molecular de BoHV - 4 en rodeos lecheros, siendo desde nuestro punto de vista necesario debido a las alteraciones causadas por este agente y sus posibles repercusiones en la ganadería nacional.

4 - REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

4.1 - Descripción del agente

El virus en estudio pertenece al orden Herpesvirales, familia *Herpesviridae*, subfamilia *Gammapherpesvirinae*, género *Rhadinovirus*, especie *virus gammaherpes bovino tipo 4* (Fig. 1)(ICTV, 2016).

El genoma del BoHV - 4 corresponde a una molécula de ADN lineal bicatenario con aproximadamente 144 kb, compuesta por una región central con bajo contenido G + C, en ambos extremos presenta repeticiones de alto contenido de esta combinación. La longitud del ADN polirrepetitivo (prADN) es específica para cada cepa y a su vez puede variar dentro de esta, estas diferencias se deben al número variable de fragmentos de 200pb cada uno los cuales constituyen sitios de recombinación (Moran y col., 2015) (Fig. 2).

El material genético se encuentra dentro de una cápside con simetría icosaédrica formada por 162 capsómeros. Posee una nucleocápside rodeada por una sustancia amorfa que corresponde al tegumento, el cual contiene proteínas de regulación, a su vez este se rodea de una bicapa lipídica que presenta proyecciones glicoproteicas de 8 nm sobre la superficie del virión. Esta estructura determina que sea un virus sensible a éter y al cloroformo, a su vez su replicación puede ser inhibida por el bromuro de dioxiuridina a 0,1mM. Presenta baja resistencia a pH bajo y puede inactivarse a temperaturas de 50 °C durante 30 minutos y mediante proceso de pasteurización (Bona y col., 2005).

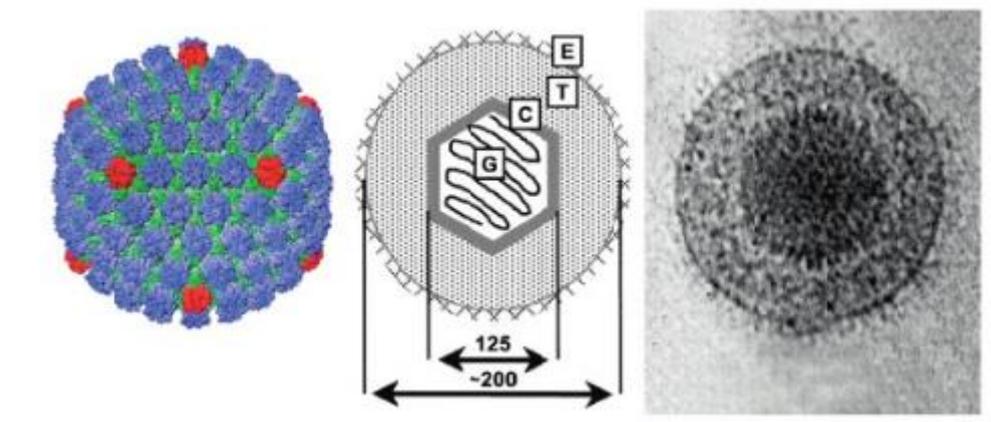


Figura 1. Virus gammaherpes bovino-4 (Fenner 4th edition, 2011).

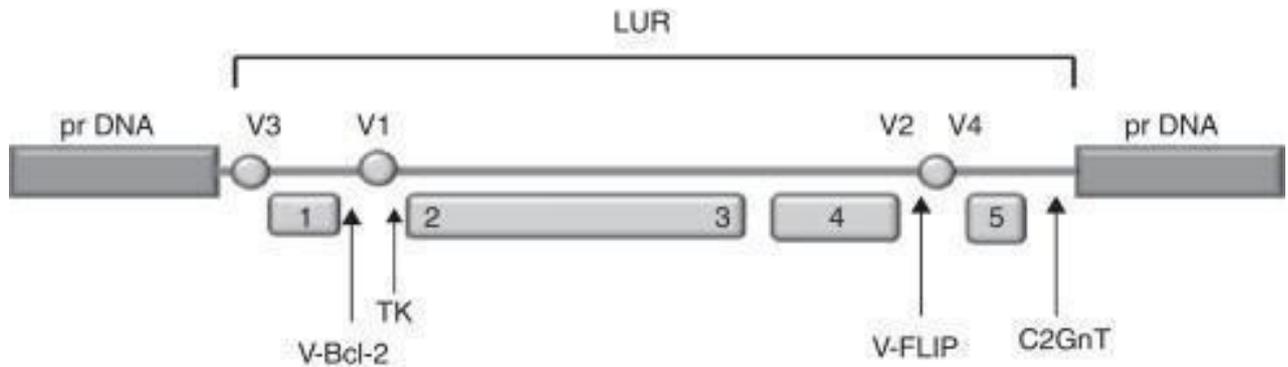


Figura 2. Organización genómica del BoHV – 4. LUR: región larga única. PrDNA: ADN polirrepetitivo. Los genes se agrupan en 5 rectángulos. Adaptada de Markine – Goriaynoff y col. (2003).

4.2 - Replicación y latencia

Es característico de la familia *Herpesviridae* replicar su genoma en el núcleo de la célula huésped, utilizando a ésta para su síntesis proteica (Meyer y col., 1999). La multiplicación primaria de BoHV - 4 se realiza en las células epiteliales de la mucosa (Campos y col., 2014). La intensidad con que se da depende fundamentalmente de la respuesta inmune adquirida por la exposición natural al virus (Pastoret y col., 1979), de forma tal que cuando aquella es exagerada se produce diseminación y posiblemente transmisión a hospederos susceptibles (Narita y col., 1978; Ackermann y col., 1982; Thiry y col., 1987). Posterior a la multiplicación se disemina dentro del organismo en células mononucleares. Durante la fase aguda de la infección el virus se replica en los linfocitos, ocurriendo una multiplicación masiva entre la séptima y octava semana post infección permaneciendo en estado latente, siendo así la persistencia de la infección de por vida en el hospedador. Hay replications virales que derivan en la diseminación y transmisión de la enfermedad. El fenómeno conocido como reactivación de la latencia, generalmente se asocia a situaciones de estrés natural o artificial como pueden ser infecciones intercurrentes o transporte (Morán y col, 2015). La multiplicación viral también puede ser reactivada por corticosteroides. Ambos factores (estrés y corticoides) presentes al momento del parto (Chastant-Maillard, 2013).

Como todo *gammaherpesvirus* posee la capacidad de replicarse en células linfoides, y de esta forma persiste en linfocitos y macrófagos, pero también se lo ha detectado en células de tejido nervioso periférico y/o central, siendo ocasionalmente detectado en ganglio trigémino en ganado infectado naturalmente (Campos y col., 2014). La reactivación solo ocurre en una pequeña proporción de neuronas (Jones y col., 2006). Del cuerpo de las neuronas las cápsides virales son transportadas de manera

anterógrada con movilidad bidireccional hasta alcanzar el axón (Smith y col., 2001). Estos axones están unidos a células de la mucosa donde promueven la liberación viral (Enquist y col., 2002).

La persistencia de la infección es de por vida en el hospedador, con replicaciones virales restringidas pero recurrentes que derivan en la diseminación y transmisión viral, a este mecanismo se le denomina latencia, por lo que se considera a los hospedadores latentemente infectados fuentes potenciales de transmisión del virus, además se evidencia una respuesta inmune detectable a nivel poblacional (Campos, 2014).

4.3 - Epidemiología

4.3.1 – Distribución

BoHV - 4 está distribuido mundialmente y se ha aislado en animales sanos como enfermos, aunque no se ha puesto de manifiesto el riesgo que podría representar para la salud pública (Donofrio y col. 2000; Nikolin y col., 2008; Bilge-Dagalp y col., 2010; 2012).

El primer aislamiento del BoHV - 4 fue realizado en Hungría en 1963 en terneros con queratoconjuntivitis y enfermedad respiratoria dando origen a dos grupos de cepas prototipo: el grupo americano tipo DN599 y el grupo europeo tipo Movar (Mohanty y col., 1971)

4.3.2 - Transmisión

BoHV - 4 puede transmitirse tanto de forma horizontal como vertical. La forma horizontal se produce por contacto directo e indirecto mediante secreciones o fómites. Como posibles fuentes de infección deben considerarse las secreciones nasales, orales y genitales. El virus puede ser eliminado de forma intermitente en algunos casos (Campos y col., 2014).

Estudios realizados en ovocitos extraídos de ovarios de mataderos indican la implicancia de la infección temprana sobre la transmisión vertical, demostrándose que el virus es capaz de atravesar la barrera placentaria y replicarse dentro del feto (Chastant – Maillard, 2013).

Puede además, según González Altamiranda y col. (2015) transmitirse potencialmente en embriones en edad de transferencia, representando un riesgo para la reproducción de estos; aunque anteriormente Chastant-Maillard (2013), habría descartado cualquier riesgo para la producción de embriones tanto in vivo

como in vitro, asegurando que el tratamiento de embriones con tripsina libera al BoHV -4 de la zona pelúcida. Es decir que este se adhiere a esa estructura hasta el séptimo lavado de embriones recogidos in vivo, por lo que el virus no sería infeccioso para las células embrionarias a excepción de casos en los que se exista ruptura de la zona pelúcida.

En estudios realizados en vacas gestantes inoculadas con cepa LVR140, se aisló el virus de muestras de útero, de loquios y ganglios ilíacos posterior al parto; también se aisló y detectó mediante PCR en leche de vacas inoculadas por vía intramamaria con cepas holandesas (Welleberg y col., 2001). Los mismos resultados se obtuvieron de infecciones naturales, donde se detectó la presencia de ADN viral en células epiteliales de conductos mamarios y en leche de vacas con mastitis (Miyano y col., 2004; Izumi y col., 2006).

4.3.3 - Antecedentes en la región

En Argentina, el BoHV-4 fue aislado y caracterizado en el año 2007 siendo este aislamiento obtenido de muestras de mucus cérvico-vaginal de vacas que abortaron, también fue aislado de hisopados nasales y pulmón de bovinos con diversos cuadros clínicos y de semen congelado, desde entonces el número de aislamiento ha ido en aumento (Morán y col., 2015).

En Brasil, en el estado de Minas de Gerais reportaron casos en terneros con signos neurológicos (Costa y col., 2011) y en Paraná se aisló de muestras extraídas de hembras con antecedentes de abortos (Kruger y col., 2015).

En Chile pudo aislarse de tejidos fetales provenientes de abortos (Lértora, 2003).

Estudios comparativos en el departamento de Caquetá Colombia muestran mayor seroprevalencia en búfalos, particularmente búfalos africanos los que podrían considerarse como reservorio natural del virus. Por el contrario, se encontró que en bovinos es mayor la presencia de BoHV - 1 (Motta y col., 2013).

4.3.4 -Implicancia clínica el virus

Su impacto negativo en el rendimiento reproductivo ha sido sugerido por estudios epidemiológicos donde se puede ver que la seroprevalencia contra BoHV-4 es mayor en hembras que abortan y en hembras que manifiestan repetición de celos que en hembras que no presentan signos reproductivos patológicos (Kale y col., 2011; Motta y col., 2013). Tal es así que en los últimos años ha sido reconocido como un patógeno del sistema reproductivo (Donofrio y col., 2009).

Varios estudios han establecido una relación entre la respuesta de anticuerpos a BoHV - 4 y la aparición de problemas de fertilidad (Welleans y col., 1986; Czaplicki y Thiry, 1998; Monge y col., 2006). También estos autores han utilizado una PCR anidada para la detección del genoma la cual fue descrita por Egyed (1996). Además se han realizado estudios filogenéticos donde se pudo ver alta variabilidad genética entre cepas de campo (Verna y col., 2012).

BoHV - 4 puede causar abortos que rara vez son diagnosticados, así como también mastitis o lesiones en ubres asociadas a cambios en la leche (Donofrio, 2009). En el caso de machos expuestos al BoHV - 4 pueden llegar a presentar orquitis y/o epididimitis (Motta y col., 2013).

No se han determinado variaciones significativas entre razas frente a la prevalencia de anticuerpos, aunque sí está altamente correlacionada con la edad de los animales, ejemplares más viejos resultaron mayormente infectados que los jóvenes (Elhassan y col., 2011). Dagalp y col. (2007), aseguraron que las hembras muestran mayor cantidad de anticuerpos que los machos, lo cual cabe destacar que es una característica compartida con BoHV – 1.

En lugares como Turquía se ha determinado que la infección de BoHV – 4 varía entre órganos de fetos de corderos abortados sin demostrar repercusión reproductiva alguna en el ganado; también ésta baja infección se determinó para BoHV – 1, no siendo igual para diarrea viral bovina, quien está presente en esta región y juega un papel importante en casos de abortos en ganado bovino (Yilmaz y col., 2015).

4.3.5 - Virus *Gammaherpes bovino 4* en el Uruguay

En cuanto a nuestro país, las pérdidas reproductivas (11 – 12%) (Baroni, 2017) son el principal problema en la ganadería de cría a nivel nacional, con índices de procreo que rondan el 70% (Uruguay XXI, 2015). Actualmente, se consideran de importancia en esta casuística enfermedades virales como rinotraqueitis viral bovina (BoHV - 1) y diarrea viral bovina (VDVB) entre otras, pero se desconoce la presencia del virus gammaherpes bovino 4 a nivel nacional y cuál es el impacto que el mismo puede tener en la salud animal. Este sería entonces el primer estudio de BoHV - 4 en nuestro país.

4.4 - Patogenia y manifestaciones clínicas causadas por BoHV - 4

Al BoHV - 4 cada vez más se lo responsabiliza de problemas reproductivos. Este infecta las células mononucleares de la sangre y presenta tropismo específico

por el endotelio vascular, tejido mamario, endometrio y tejidos fetales. Ha sido aislado, aunque no de rutina, en una gran variedad de casos clínicos, causando principalmente metritis, vaginitis y mastitis, pero también endometritis, aborto y orquitis. Puede también encontrarse en hueso o células de la médula a los 62 días post incubación (Chastant-Maillard, 2013).

Otros autores determinan que la presencia de BoHV - 4 estimula la producción de prostaglandina E (PGE) por parte de las células endometriales. Esta es mediadora de la respuesta inflamatoria frente a infecciones bacterianas, así como inductora de la replicación del propio virus durante la reactivación (Campos y col, 2014). En casos en que se expuso células del estroma uterino a la presencia de BoHV-4 se determinó que estas produjeron PGE en cantidades superiores a las fisiológicas (Motta y col., 2013). También Donofrio y col. (2005) y Morán y col. (2015) mencionan la asociación de este virus con otros patógenos en casos de metritis, donde esta podría ser exacerbada por el reclutamiento de macrófagos en el sitio de inflamación. La endometritis bacteriana produciría secreción de PGE en células endometriales y a su vez cumple un papel importante en la reactivación y posterior replicación del BoHV – 4 (Donofrio y col., 2005; Donofrio y col., 2007).

Donofrio y col. (2010) han propuesto que la infección persistente de macrófagos con el BoHV – 4 es secundaria, de igual forma que la infección bacteriana en la metritis postparto del bovino.

Su patogenicidad intrínseca puede parecer baja ya que los síntomas se manifiestan cuando BoHV - 4 coopera con las bacterias dentro del útero o la glándula mamaria, por lo que, en algunos casos, es más bien considerado como un cofactor para el desarrollo de una reacción inflamatoria iniciada por bacterias (Chastant-Maillard, 2013).

Deim y col.,(2007) sugieren que este virus produce destrucción de células placentarias llevando a una alteración del equilibrio inmune durante la gestación, produciendo eventualmente a abortos.

BoHV – 4 ha sido aislado de ganado con una amplia variación de lesiones inflamatorias, como dermatitis pustular mamaria, metritis, neumonía, diarrea, enfermedades respiratorias, dermatitis interdigital y vaginitis (Bartha y col., 1966; Thiry y col., 1989; Miyano y col., 2004; Nikolin y col., 2007). En particular, Bellino y col. (2015) realizaron seguimientos de casos en vacas Holando en las que los signos inespecíficos observados eran: decúbitos forzados, anorexia, depresión de estado mental, pirexia (41°C), dermatitis pápulo-costrosa pruriginosa de la cabeza, cuello, cola y ubre, hemorragia de mucosa vulvar y diarrea sanguinolenta. Estos autores observaron que las mismas respondieron de forma negativa a estudios toxicológicos al igual que a determinaciones serológicas para distintos virus, resultando positivas a

la técnica de Nested PCR para BoHV – 4, acusando a éste como responsable patógeno de tales casos.

4.5 - Respuesta inmune del hospedador a la infección

La respuesta humoral del ganado bovino después de la infección por BoHV-4 se caracteriza por la escasa producción de anticuerpos neutralizantes con baja avidéz (Thiry y col., 1990; Debuissou y col., 1990).

En prácticas experimentales en bovinos y conejos se detectó serología positiva por ELISA, sin embargo, estos resultados se tornaron negativos en la detección de anticuerpos neutralizantes mediante pruebas de neutralización viral (Essmall y col., 1999; Asano y col., 2003).

No hay evidencias de reacción cruzada entre anticuerpos específicos de Herpes virus tipo 1 con los resultados de ELISA para Herpes virus tipo 4 (Kruger y col., 2015).

4.6 – Diagnóstico

4.6.1 – Detección serológica

El diagnóstico del BoHV-4 puede realizarse mediante la detección de anticuerpos específicos en suero de los animales. La serología positiva es un indicador confiable de infección. Cualquier animal con presencia de anticuerpos es considerado un portador y un potencial excretor intermitente, exceptuando casos de animales jóvenes que se puedan haber infectado de forma pasiva y/o animales vacunados (Favoreel y col., 2000).

Entre las técnicas que se han empleado para diagnosticar esta enfermedad a nivel mundial, en diferentes laboratorios, se destacan la seroneutralización (SN) y ensayos inmunoenzimáticos sobre fase sólida (ELISA). Dichas técnicas también son empleadas usualmente para detectar anticuerpos contra BoHV - 1 en suero, destacándose éstas por su alta sensibilidad (Puntel, 1999; Manual de la OIE, 2008). También se ha utilizado ELISA para la detección de antígeno viral de forma segura (Pico y col., 1997).

La desventaja de los métodos serológicos radica en la imposibilidad de diferenciar animales vacunados de infectados naturalmente cuando se emplean vacunas convencionales, lo que no ocurre hasta el momento en Uruguay.

4.6.2 – Detección molecular

La reacción de cadena de la Polimerasa (PCR), ya sea convencional o anidada, es la técnica de elección para la amplificación de diferentes regiones de ADN viral y con la posterior secuenciación se ha logrado identificar una gran cantidad de cepas de BoHV - 4 (Morán y col., 2015).

La PCR sigue siendo hoy la técnica molecular más utilizada para el diagnóstico de BoHV - 4 (Newcoer&Govens, 2016). Presenta como ventaja alta sensibilidad y especificidad, rapidez en la ejecución y aplicación en distintas muestras clínicas a diferencia del aislamiento viral, PCR puede utilizarse en muestras donde el virus se encuentra inactivado o en estado latente (Campos y col., 2009).

4.7 - Control

Actualmente en nuestro país no se dispone de estrategias para el control de la infección por el BoHV - 4 debido al desconocimiento de la misma. En contrapartida, es de interés creciente en la región y varios países del mundo, el estudio de esta virosis que parece tener gran impacto reproductivo debido a los diferentes cuadros que produce y su complejidad en el diagnóstico clínico.

BoHV - 4 es útil como potencial vector para la producción de vacunas, ya que posee una estructura genómica menos compleja comparada con otros herpesvirus, lo que permitiría una inserción estable de información genética adicional en su genoma para la elaboración de vacunas recombinantes. Además, es fácilmente reproducible en cultivos celulares y se dispone de modelos animales para su experimentación (Zimmermann y col., 2001). Actualmente se han obtenido buenos resultados en estudios en los que se utilizó una cepa apatógena de BoHV – 4 como vector de péptidos inmunogénicos de DVB y BoHV – 1. Esto confirma la potencialidad de su utilización como herramienta biológica (Donofrio y col., 2009).

5 - OBJETIVOS

5.1 - General

Diagnosticar virus Gammaherpes bovino 4 en ganado lechero del departamento de Florida, Uruguay mediante pruebas serológicas y moleculares.

5.2 - Específicos

- Detectar anticuerpos anti-BoHV-4 mediante ELISA en bovinos lecheros del departamento de Florida, Uruguay.
- Estandarizar la técnica de Nested - PCR para la detección de BoHV - 4 en células mononucleares de sangre periférica.
- Confirmar la presencia de ADN viral en muestras seropositivas mediante nPCR y secuenciación.
- Realizar el análisis filogenético de las secuencias obtenidas y compararlas con cepas de referencia y de la región.

6 - MATERIALES Y MÉTODO

6.1 – Muestras

El estudio se realizó en el Laboratorio de Inmunología de Facultad de Veterinaria utilizando 47 muestras del banco de suero conservadas a -20°C y 47 muestras de sangre periférica entera, proporcionadas por el laboratorio de Inmunología de Facultad de Veterinaria. Estas fueron extraídas de hembras bovinas, de raza Holando, primíparas y múltiparas, correspondientes a rodeos lecheros del departamento de Florida con antecedentes de problemas reproductivos.

6.2 - Detección de anticuerpos anti-BoHV-4

Para la detección de anticuerpos específicos anti BoHV - 4 se utilizó un kit comercial de Bio X Diagnostics (BIO – ABORTION ELISA KIT, Belgique, Europe). Las placas están sensibilizadas con antígenos de los agentes causales de rinotraqueitis infecciosa bovina (BoHV-1) y diarrea viral bovina, además de BoHV – 4, lo cual permitió hacer un análisis comparativo de la presencia de estos tres agentes.

Los sueros fueron diluidos 1:100, incubados en las microplacas sensibilizadas con cada agente viral (BoHV -1, VDVB, BoHV- 4), purificados, incubados durante 1 hora a temperatura ambiente. Luego de los respectivos lavados se incubaron nuevamente con el agregado del conjugado (anti-IgG bovina unida a peroxidasa) como indica el protocolo comercial respectivo. Para revelar la presencia de anticuerpos se utilizó una solución cromogénica (TMB- tetrametilbenzidina) y posteriormente se midió la intensidad de color y luz en el espectrofotómetro a 450 nm.

Para cada muestra se calculó el coeficiente mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Val (ue)} = \frac{\text{Delta OD Simple} * 100}{\text{Delta OD positive}}$$

Según la siguiente tabla se consideran coeficientes (punto de corte) negativos y positivos para los distintos agentes en cuestión.

Agente.	Coeficientes negativos.	Coeficientes positivos.
BoHV-1	<20	>=20
DVB	<27	>=27
BoHV-4	<37	>= 37

Tabla 1. Rangos de coeficientes establecidos por el Kit de ELISA para los 3 antígenos analizados.

6.3 - Extracción de ADN y Estandarización de la Nested – PCR

Se realizó la técnica de Nested PCR para la detección de genoma viral a un conjunto de 17 muestras tomadas al azar, debido a la capacidad de procesamiento con la que se contaba.

La extracción del genoma viral se hizo de las muestras de sangre por el método de Fenol-Cloroformo (Hughes y col., 1978) el cual se basa en cuatro pasos principales: lisis celular y nuclear, luego purificación del ADN, precipitación y lavado con etanol y por último re suspensión del ADN.

Se puso a punto en nuestro laboratorio un protocolo de amplificación descrito previamente por Wellenberg y col. (2001). En este paso se obtuvo un fragmento de 615pb y luego de la segunda ronda de amplificación según Campos y col. (2014), se obtuvieron fragmentos del gen que codifica para la glicoproteína B (gB) de 364pb. Estos se visualizaron en geles de agarosa al 1,5%, teñido con Good View NucleicAcidStain. El control positivo utilizado, corresponde a la cepa MOVAR del virus y fue gentilmente cedido por el grupo de investigación de la Universidad Federal de Río Grande do Sul (URFGS) - Brasil. El control negativo utilizado fue agua ultra pura. Para la Nested-PCR se realizaron dos rondas de amplificación, utilizando los 4 cebadores descritos en la tabla 2.

	Primers	Amplicon (bp)	Gen objetivo	GenBank	Referencia
PCR					
Primera ronda	gB1 5'- CCCTTCTTTACCACCACCTACA- 3'	615	glicoproteína B	AF318573 región: 11381. . .11995	Wellenberg y col., 2001
	gB2 5'- TGCCATAGCAGAGAAACAATGA- 3'				
n PCR					
Segunda ronda	PFnested 5'- CAACAACATCAACAAGCAAGC- 3'	364		AF318573 región: 11532. . .11895	Campos y col., 2014
	PRnested 5'- GACCACCCTCTGTAAACTG-3'				

Tabla 2. Descripción de la Nested PCR.

Electroforesis

Para la visualización de los productos de la n-PCR se realizó una corrida electroforética. La electroforesis es una técnica mediante la cual se separan las biomoléculas en disolución cuando se ven sometidas a un campo eléctrico. Cada molécula se desplaza por efecto del campo. La movilidad de las moléculas depende de la longitud de ésta (medida habitualmente como número de pares de bases, pb). La electroforesis separa los fragmentos de ADN de acuerdo con su longitud en pb. Se utilizó un marcador de peso molecular que indica cada 100 pb. El avance del frente de electroforesis en el gel se observa gracias a colorantes. El colorante de carga imprime color a la muestra para facilitar el proceso de carga y aumentar la densidad de la muestra con objeto de conseguir una buena distribución de muestras en cada pocillo. El colorante migra independientemente de la muestra, lo que permite el cálculo de la migración de ácidos nucleicos. Posteriormente se realizó una lectura del gel utilizando luz ultravioleta.

6.4 - Secuenciación y análisis filogenético

Los productos de PCR se enviaron a purificar y secuenciar a la empresa MacroGen Inc., Corea. La alineación de las secuencias de nucleótidos se realizó

utilizando el programa Bioedit versión 2.0 que emplea la aplicación ClustalW. Se construyó el árbol con el software MEGA 5. Este programa permitió estimar el modelo evolutivo que más se adaptó a nuestros datos y también construir el árbol filogenético. La historia evolutiva se deduce utilizando el método de “vecino más próximo”, que es un algoritmo que permite estimar la filogenia. Las cepas de referencia y de la región fueron extraídas del GenBank.

6.5 - Análisis de los datos

Se realizó un análisis descriptivo de los datos mediante el empleo de Microsoft office Excel, se elaboraron planillas donde se identificaron cada una de las muestras con un número y los resultados para BoHV-4, BoHV- 1 y DVB expresados como positivos o negativos.

7 – RESULTADOS

Teniendo en cuenta los rangos o escalas establecidos por el kit de ELISA empleado, se encontró que de las 47 muestras analizadas, el 85% (n=40) fueron seropositivas al virus gammaherpes bovino tipo 4, 91% (n= 43) lo fueron a BoHV - 1 y 34% (n=16) resultaron positivas a DVB.

También se determinó el grado de positividad de los mismos, además de comparar la presencia de BoHV - 4 con BoHV - 1 y DVB en las mismas muestras de forma simultánea. Con respecto a BoHV – 4, se pudo determinar que de los 40 (85%) animales seropositivos, 28 (70%) se manifestaron de forma débil, es decir que sus coeficientes fueron mayores o iguales a 27 pero no superaron 81. Por el contrario solo un animal mostró un coeficiente elevado, mayor a 135, el cual es considerado como fuerte, mientras que los 11 (27,5%) restantes se mantuvieron en un rango entre 81 y 135 (Tabla 3).

	Negativos	Positivos débiles	Positivos	Positivos fuertes
BoHV - 4	7 (15%)	28 (60%)	11 (23%)	1 (2%)
BoHV - 1	4 (8,5%)	21 (45%)	13 (28%)	9 (19%)
DVB	31 (66%)	14 (30%)	2 (4%)	0 (0%)

Tabla 3. Cantidad de animales (%) discriminada según los resultados de la técnica serológica utilizada, ELISA.

De los 47 (100%) animales en estudios, el 91% (43/47) resultaron positivos a BoHV-1. Cuatro ejemplares (8.5%) fueron negativos a BoHV - 1 y positivos a BoHV - 4. Mientras que 7 (15%) animales fueron negativos a BoHV - 4 y positivos a BoHV – 1. Solo 2 animales fueron positivos a DVB y BoHV-4 y uno fue positivo a DVB y BoHV-1, en cuanto a la mayoría que fueron negativos a DVB, a la vez resultaron positivos a los BoHV-4 y BoHV-1 (Tabla 4).

		Negativos		
		BoHV – 4	BoHV – 1	DVB
Positivos	BoHV – 4	-	4	25
	BoHV – 1	7	-	26
	DVB	2	1	-

Tabla 4. Relación entre resultados positivos simultáneos a ELISA.

A 17 de los animales que se les realizó la técnica de Nested PCR para la detección de genoma viral, obteniéndose 4 negativos y 13 positivos obteniendo en esta instancia resultados netamente positivos, confirmando la infección de las mismas por BoHV – 4. (Fig. 3).

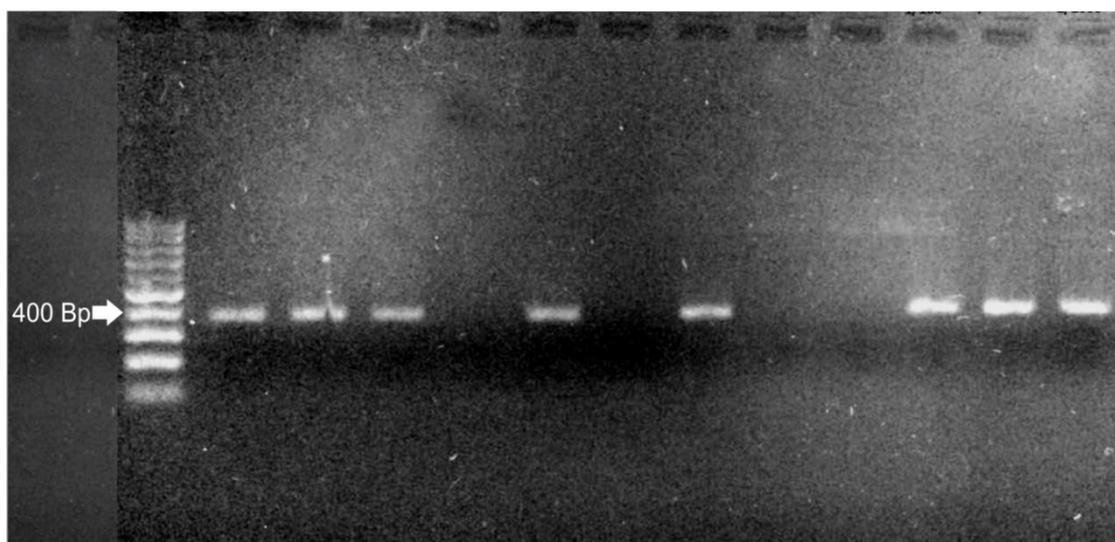


Figura 3. Gel de agarosa de la nested PCR donde se observa la amplificación del fragmento de 364 pb correspondiente a un fragmento del gen que codifica para la glicoproteína B de BoHV-4. En el carril 1 se observa el peso molecular de 100 pb, en los carriles 2,3,4,6 y 8 se observan 5 muestras positivas, en los carriles 5,7 y 9 muestras negativas, carril 10 control negativo, carril 11 control positivo dilución 1/100, carril 12 control positivo 1/500, carril 13 control positivo dilución 1/1000.

Por otro lado, se enviaron a secuenciar los 13 amplicones obtenidos, generando así la filogenia correspondiente a un fragmento del gen gB del BoHV-4 (Fig. 4).

Las muestras nacionales fueron comparadas con 28 secuencias de BoHV-4, fue utilizado como grupo externo el virus: *Macaca mulatta* rhadinovirus.

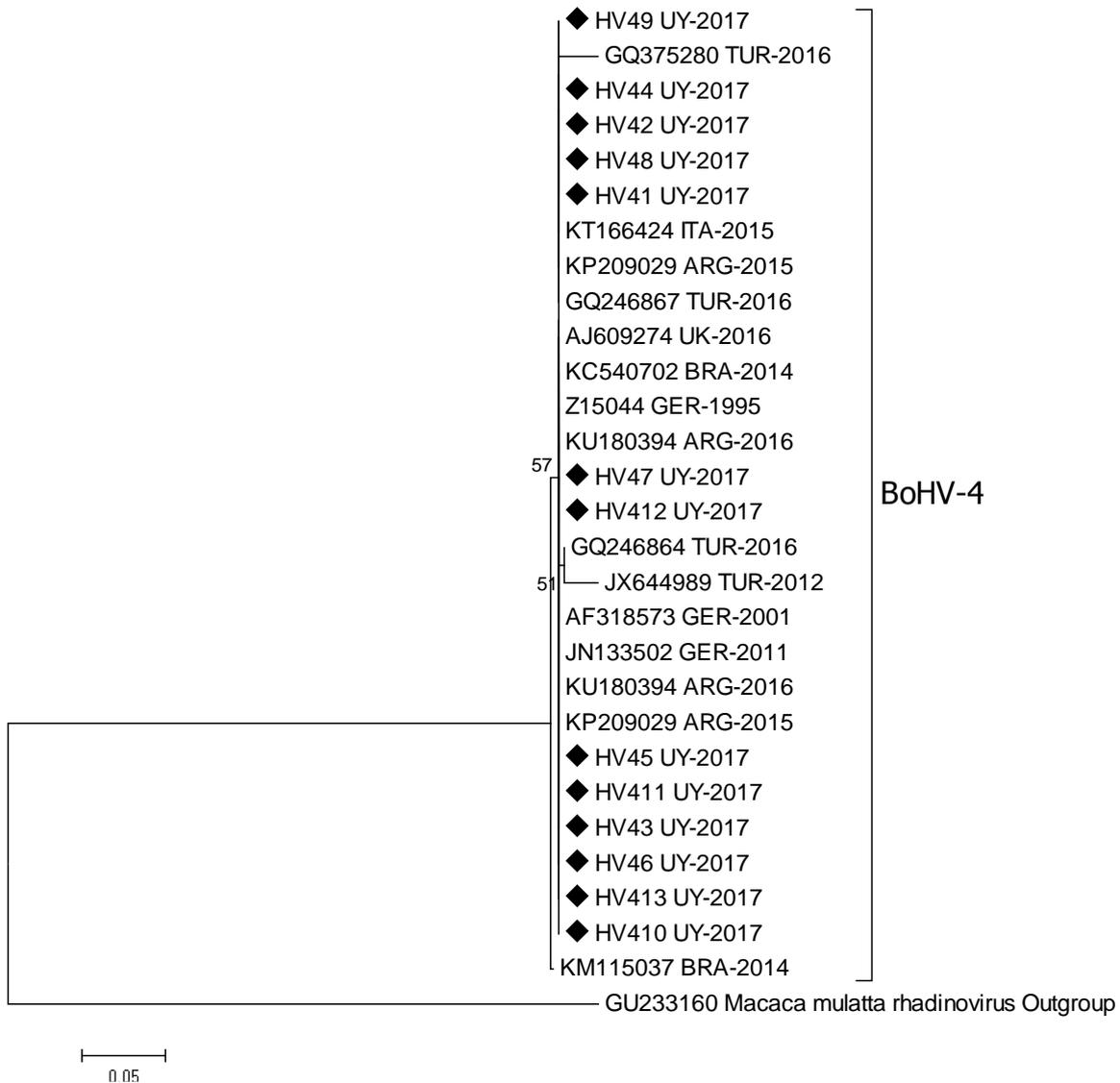


Figura 4. Árbol filogenético del fragmento del gen que codifica para gB de BoHV-4. Se muestra la relación filogenética de secuencias de Uruguay (rombo negro) y cepas de referencia pertenecientes al genBank provenientes de Brasil, Argentina, Turquía, Alemania y Reino Unido.

8 – DISCUSIÓN

En nuestro país BoHV-4 era desconocido hasta este momento, siendo esta la primera detección tanto serológica como del genoma viral propiamente dicho. Se asocia el BoHV - 4 con una amplia variedad de cuadros clínicos, ya sean infecciones respiratorias, reproductivas, así como animales aparentemente sanos en diferentes partes del mundo (Donofrio y col., 2000; Miyano y col., 2004; Izumi y col., 2006; Nikolin y col., 2007; Bilge-Dagalp y col., 2012; Moran y col., 2015). Además, se detectó un alto nivel de infección por este agente en bovinos lecheros donde el principal signo es la repetición de celo (Kale y col., 2011).

En países donde se ha determinado la presencia de BoHV - 4, han encontrado una prevalencia generalmente baja, oscilando entre 16 y 30%, con bajos títulos de anticuerpos neutralizantes (1:8 a 1:64) (Frazier y col., 2002). En el año 2013 en Colombia se estudiaron 7 predios, encontrando que la totalidad de los rodeos eran positivos y el promedio de seropositividad rondaba en 72,4% (Motta y col., 2013).

En esta tesis se detectó un 85% de seropositividad en nuestro muestreo, donde los animales tenían antecedentes de problemas reproductivos, siendo esta la primera evidencia de la presencia de *Gammaherpesvirus* bovino 4 en Uruguay.

Estos resultados coinciden con los estudios publicados por Campos y col. (2014) quien comprueba la presencia simultánea de diferentes géneros de herpesvirus. Costa y col. (2011), encontraron que bovinos infectados con BoHV - 4 también lo eran por BoHV -5, indicando que ambos ADN virales coexisten en células de distintos fragmentos del sistema nervioso central.

Pudimos constatar que de 39 muestras positivas a 2 o más de estas infecciones, 36 eran positivas a BoHV - 4 y BoHV – 1 por ELISA. A su vez, se confirma lo señalado por Frazier y col. (2002), los cuales reportaron que la mayoría de los ejemplares positivos lo son de forma débil, en nuestro estudio más del 50% de los sueros positivos (85%), fueron levemente positivos.

En cuanto a la posibilidad de que exista reacción cruzada entre BoHV-4 y otros herpesvirus bovinos relacionados, Kruger y col. (2015) (b) no encontraron evidencia de ello.

Los resultados obtenidos permitirán profundizar en un futuro cercano sobre los genotipos virales circulantes, así como asociarlos con cuadros clínicos o antecedentes reproductivos de interés para el país.

En la actualidad los problemas reproductivos son motivo de importantes pérdidas económicas por metritis, abortos, períodos interpartos prolongados, repetición de celos, etc. Otros agentes como DVB, IBR o *Leptospira* son considerados los

principales agentes causales de estos trastornos reproductivos que pueden ocasionar grandes pérdidas (Easton, 2006; Mosca, 2013), sin embargo no se ha tenido en cuenta a BoHV - 4, el que hoy en día la bibliografía lo ha asociado principalmente a infecciones del tracto reproductivo. En Argentina se encontró una alta variabilidad de cepas aisladas de muestras provenientes de vacas que presentaron abortos, destacándose así el significado de las investigaciones sobre el papel del virus como agente infeccioso capaz de provocar enfermedades reproductivas en el ganado bovino (Moran y col., 2015). Donofrio y col. (2009) aislaron y secuenciaron BoHV – 4 del útero de vacas afectadas con metritis postparto. Otro estudio confirmó en 9 casos analizados, a este virus como potencial causante de aborto (Verna y col. 2012). Por lo que se evidencia cada vez más la responsabilidad de este agente frente a este problema.

De la filogenia obtenida se destaca que las cepas de BoHV-4 en Uruguay están agrupadas con otras cepas de la región: Brasil, Argentina y el mundo: Italia y Turquía. Confirmando que la región de gB se conserva efectivamente entre los distintos aislados de BoHV-4 en diferentes regiones del mundo.

9- CONCLUSIONES

Si bien en la actualidad las enfermedades reproductivas, específicamente las virosis cada día ocupan un lugar más importante, y los productores han incorporado planes de inmunización para el ganado mediante la utilización de vacunas polivalentes (IBR, DVB), cabe mencionar que existe escaso diagnóstico, inclusive cuando son tan bajos los porcentajes de preñez.

El diagnóstico del virus en la región y los reportes de su incidencia en la reproducción, motivaron la búsqueda del virus gammaherpes bovino tipo 4 en nuestros rodeos.

Este estudio es la primera evidencia en nuestro país de la presencia de BoHV - 4.

Es necesario realizar más investigaciones para poder aislar el virus y observar cuales son los signos clínicos asociados al virus que están presentes en nuestro país.

10 – BIBLIOGRAFÍA

1. Ackermann, M.; Peterhans, E.; Wyler, R. (1982) DNA of bovine herpesvirus type 1 in the trigeminal ganglia of latently infected calves. *Am J. Vet Res* 43(1): 36-40.
2. Asano A, Inoshima Y, Murakami K, Iketani Y, Yamamoto Y, Sentsui H. (2003). Latency and persistence of bovine herpesvirus type 4, strain B11-41, in bovine nervous tissues. *J VetMedSci.*; 65:87-93.
3. Baroni L. 2017. ¿Bajos porcentajes de gestación o de procreo? Disponible en:https://www.planagropecuario.org.uy/publicaciones/revista/R92/R92_26.htm Fecha de consulta 3/12/2017
4. Bartha, A.; Juhasz, M.; Liebermann, H. (1966). Isolation of a bovine herpesvirus from calves with respiratory disease and keratoconjunctivitis. *Acta VetAcadSciHung* 16:357–358.
5. Bellino, C.; Iussich, S.; Biasato, I.; Peletto, S.; Caruso, C.; Gianella, P.; Cagnasso, A.; D'Angelo, A. (2015). Potential Pathogenetic Role of Bovine Herpesvirus 4 in Two Dairy Cows with Dermatitis-Pyrexia-Hemorrhagic Syndrome. *J. ClinMicrobiol* 53:2763–2767.
6. Bilge-Dagalp S, Gungor E, Demir A, Pinar-Muz D, Yilmaz V, Oguzoglu T, Ataseven V, Alkan F., (2010). The investigation of the presence of bovine herpesvirus type 4 (BoHV-4) in cows with metritis in a dairy herd. *Ankara UnivVetFakDerg.*; 57:87 - 91.
7. Bilge Dagalp, S.; Alkan, F.; Caliskan, E.; Yildirim, Y.; Oguzoglu, T.C.; Can Sahna, K.; Burgu, I. (2012). The investigation of the herpesviruses (BoHV-1 and BoHV-4) on the occurrence of the reproductive disorders in dairy cattle herds, Turkey. *Rev. Méd. Vet.*, 163: 206-211.
8. Bona, C., Dewals, B., Wiggers, L., Coudijzer, K., Vanderplasschen, A., Gillet, L. (2005). Pasteurization of milk abolishes bovine herpesvirus 4 infectivity. *J. Dairy sci.*;88:3079-83.
9. Campos, FS., Franco, AC., Oliveira, MT., Firpo, R., Strelczuk, G., Fontoura, FE., Kulmann, MIR., Maidana, S., Romera, SA., Spilki, FR., Silva, AD., Hubner, SO., Roehe, PM. (2014): Detection of bovine herpesvirus 2 and bovine herpesvirus 4 DNA in trigeminal ganglia of naturally infected cattle by polymerase chain reaction. *VetMicrobiol*, 171(1-2): 182 – 188.
10. Campos, F.S.; Franco, A.; Hübner, S.; Oliveira, M.; Silva, A.; Esteves, P.; Roehe, P.; Rijsewijk, F. (2009) High prevalence of co-infections with bovine herpesvirus 1 and 5 found in cattle in southern Brazil. *VetMicrobiol* 139: 67-73.
11. Chastant-Maillard S. (2013) Impact of Bovine Herpesvirus 4 (BoHV-4) on Reproduction. *TransboundEmergDis.*; 62(3): 245 - 251.

12. Costa E, Vasconcelos A, Bomfim M, Amorim H, Lima G, Coelho F, Resende M., (2011). Neurological disorder in cattle associated with bovine herpesvirus 4. *Arq Bras Med Vet Zootec.*; 63:828-835.
13. Czaplicki, G.; Thiry, E. (1998). An association exists between bovine herpesvirus-4 seropositivity and abortion in cows. *Prev. Vet. Med.* 33: 235–240.
14. Dagalp, S.B.; Demir, A.B.; Gungor, E.; Alkan, F. (2007). The seroprevalence of bovine herpes virus type-4 (BoHV- 4) infection in dairy herds in Turkey and possible interaction with reproductive disorders. *RevMedVet*, 158: 201-205.
15. Deim, Z.; Szeredi, L.; Egyed, L.; (2007). Detection of bovine herpesvirus 4 DNA in aborted bovine fetuses. *Can J VetMed* 71: 226-229.
16. Dewals, B.; Gillet, L.; Gerdes, T.; Taracha, E. L. N.; Thiry, E.; Vanderplasschen, A. (2005). Antibodies against bovine herpesvirus 4 are highly prevalent in wild African buffalo throughout eastern and southern Africa. *VetMicrobiol* 110: 209–220.
17. Dewals, B.; Thirion, M.; Nicolas Markine-Goriaynoff, N.; Gillet L.; de Fays, K.; Minner, F.; Daix, V.; Sharp, P.; Vanderplasschen, A.; (2006). Evolution of Bovine herpesvirus 4: re-combination and transmission between African buffalo and cattle. *J of Virol.*, 87: 1509–1519.
18. Donofrio G, Flammini C, Scatozza F, Cavarani S. (2000). Detection of bovine herpesvirus 4 (BoHV-4) DNA in the cell fraction of milk of dairy cattle with history of BoHV-4 infection. *J ClinMicrobiol.*; 38:4668-71.
19. Donofrio G, Cavarani S, van Santen V, Flammini C. (2005). Potential secondary pathogenic role for bovine herpesvirus 4. *J ClinMicrobiol.*; 43:3426-6.
20. Donofrio G, Herath S, Sartori C, Cavarani S, Flammini C, Sheldon M. (2007). Bovine herpesvirus 4 is tropic for bovine endometrial cells and modulates endocrine function. *Reproduction*; 134:183-197.
21. Donofrio G., Franceschi V., Capocefalo A., Cavarani S., Sheldon I.M. (2009). Isolation and characterization of bovine herpesvirus 4 (BoHV-4) from a cow affected by post-partum metritis and cloning of the genome as a bacterial artificial chromosome. *Reprod. Biol. Endocrinol*, 7:83.
22. Donofrio, G.; Capocefalo, A.; Franceschi, V.; De Lorenzi, L.; van Santen, V.; Parma, P. (2010). Integration of bovine herpesvirus 4 genome into cultured persistently infected host cell genome. *Virology*, 7:246.
23. Dubuisson J, Guillaume J, Boulanger D, Thiry E, Bublout M, Pastoret P., (1990). Neutralization of bovine herpesvirus type 4 by pairs of monoclonal antibodies raised against two glycoproteins and identification of antigenic determinants involved in neutralization. *J Gen Virol.*;71:647-653.
24. Easton Aizen, María Cristina DMTV (2006). “Estudio patológico de las principales causas infecciosas en el aborto bovino en Uruguay”. Tesis de

Maestría en Salud Animal. Universidad de la República – Facultad de Veterinaria – Programa de Posgrados.

25. Elhassan, A.; Fadol, M. A.; El-Hussein, A. M. (2011). Seroprevalence of Bovine Herpes Virus-1, Bovine Herpes Virus-4 and Bovine Viral Diarrhea Virus in Dairy Cattle in Sudan. *Pakistan Vet. J.*, 31(4): 317-320.
26. Enquist, L.W.; Tomishima, M.J.; Gross, S.; Smith, G.A. (2002) Directional spread of an α herpesvirus in the nervous system. *Vet. Microbiol.* 86:5-16.
27. Essmail M, Baker D, Collins J, Vandewoude S, Salman M, Hegazy A.(1999). Dot immunobinding assay for detection of bovine herpesvirus 4 antibodies in rabbits. *J VetDiagnInvest.*; 11:237-239.
28. Favoreel, H. W.; Nauwynck, H. J., Pensaert, M. B. (2000): Immunological hiding of herpesvirus-infected cells. *Arch. Virol.* 145(7): 1269 – 1290.
29. Fenner *Veterinary Virology* 4th edition (2011).
30. Frazier, K.S.; Baldwin, C.A.; Pence, M.; West, J.; Bernard, J.; Liggett, A.; Miller, D.; Hines, M.E. (2002). Seroprevalence and comparison of isolates of endometriotropic bovine herpesvirus-4. *J. Vet. Diagn. Invest.* 14: 457–462.
31. González Altamiranda, E.; Manrique, J.; Pérez, S.; Ríos, G.; Odeón, A.; Leunda, M.; Jones, L.; Verna, A.; (2015). Molecular Characterization of the First Bovine Herpesvirus 4 (BoHV-4) Strains Isolated from In Vitro Bovine Embryos production in Argentina. *Plosone* 10:7.
32. Hughes SH, Shank PR, Spector DH, kung HJ, Bishop JM, Varmus HE, Vogt PK, Breitman ML (1978). Proviruses of aviansarcoma virus are terminally redundant, co-extensive with unintegrated linear DNA and integrated at many sites. *Cell* 15:1397-1410.
33. ICTV., International Committee on Taxonomy of Viruses. (2016) Disponible en:<https://talk.ictvonline.org/> Fecha de consulta: 16/11/2017.
34. Izumi, Y.; Tsuduku, S.; Murakami, K.; Tsuboi, T.; Konishi, M.; Haritani, M.; Kamiyoshi, T.; Kimura, K.; Sentsui, H. (2006). Characterization of Bovine herpesvirus type 4 isolated from cattle with mastitis and subclinical infection by the virus among cattle. *J. Vet. Med. Sci.* 68: 189–193.
35. Jones, C.; Geiser, V.; Henderson, G.; Jiang, Y.; Meyer, F.; Perez, S.; Zhang, Y. (2006) Functional analysis of bovine herpesvirus 1 (BHV- 1) genes expressed during latency. *Vet. Microbiol.* 113:199-210.
36. Kale M, Ata A, Kocamüftüoğlu M, Hasircioğlu S., (2011). Bovine herpes virus type 4 (BHV-4) infection in relation to fertility in repeat breeder dairy cows. *Act. VetBeograd.*; 61:13-19.
37. (a) Krüger, E., Penha, T., Eira, D., Roehe, P., Ribeiro, M., Soccol, T. (2015). Bovine herpesvirus 4 in Parana State, Brazil: case report, viral isolation, and molecular identification. *Soc. Brasileira de Microbiol.*
38. (b) Krüger E. R., Penha T. R., Hummelgen F. C., Agottani J. B., Reva D., Gonçalves R. y Thomaz-Soccol V. (2015). Development and Evaluation of an

- Indirect ELISA: Serological Survey to Detect Specific Antibodies to Bovine Herpesvirus 4. *Brazilian Arch. Biol. Technol*, 58(5): 725 - 731.
39. Lértora WJ, (2003). Diarrea viral bovina: actualización. *RevVet.*; 14:1
 40. Markine – Goriaynoff, N. Minner, F. de Fays, K. Gillet, L.; Thiry, E.; Pastoret, P.; Vanderplasschen, A.; (2003). L'herpesvirusbovin 4. *Ann MédVét.*, 147:215 – 247.
 41. Meyer, G.; Bare, O.; Thiry, E. (1999) Identification and characterization of bovine herpesvirus type 5 glycoprotein H gene and gene products. *J. Gen. Virol.*, 80:2849–2859.
 42. Miyano, H.; Haritani, M.; Sentsui, H.; Tsuboi, T.; Tanimura, N.; Kimura, K.M.; Kobayashi, M.; Obara, N.; Akimoto, Y. (2004). Mammary lesions associated with bovine herpesvirus type 4 in a cow with clinical mastitis. *J VetMedSci* 66:457– 460.
 43. Monge, A.; Elvira, L.; Gonzalez, J.V.; Astiz, S.; Wellenberg, G.J. (2006). Bovine herpesvirus 4 associated postpartum metritis in a Spanish dairy herd. *Res. Vet. Sci.* 80: 120–125.
 44. Morán, P.E.; Favier, P.A.; Lomónaco, M.; Catena, M.C.; Chiapparrone, M.L.; Odeón, A.C.; Verna, A.E.; Pérez, S.E. (2013) Search for the genome of bovine herpesvirus types 1, 4 and 5 in bovine semen. *Open Vet J.* 3(2):126-30.
 45. Morán P. E., Pérez S. E., Odeón A. C., Verna A. E. (2015). Herpesvirus bovino 4 (BoHV-4): aspectos generales de su biología y situación en la República Argentina. *Rev Argent Microbiol* 47(2):155 - 166.
 46. Mosca De Sarak, G. (2013) Aborto Bovino: Principales agentes infecciosos y parasitarios diagnosticados en el Uruguay. Tesis de grado. - Universidad de la República - Facultad de Veterinaria.
 47. Motta Giraldo, J, García, I, Abeledo, M.A. (2013) Prevalencia de anticuerpos al virus de la diarrea viral bovina, Herpesvirus bovino 1 y Herpesvirus bovino 4 en bovinos y búfalos en el Departamento de Caquetá, Colombia. *Rev. Salud Anim* 35 (3): 174 – 186.
 48. Mohanty S, Hammond R, Lillie M., (1971). A new bovine herpesvirus and its effects on experimentally infected calves. *ArchGesamte Virusforsch.*;33: 394-395.
 49. Narita, M.; Inui, S.; Namba, K.; Shimizu, Y. (1978) Neural changes in calves after in-traconjunctival inoculation with infectious bovine rhinotracheitis virus in calves treated with dexamethasone. *Am. J. Vet. Res.*, 39:1399-1403.
 50. Newcomer, B.W.; Givens, D. (2016) Diagnosis and Control of Viral Diseases of Re-productive Importance: Infectious Bovine Rhinotracheitis and Bovine Viral Diarrhea. *VetClin North Am FoodAnimPract.* 32(2):425-41.
 51. Nikolin, V.M.; Donofrio, G.; Milosevic, B.; Taddei, S.; Radosavljevic, V.; Milicevic, V. (2007). First Serbian isolates of bovine herpesvirus 4 (BoHV 4) from a herd with a history of postpartum metritis. *New Microbiol* 30:53–57.

52. Nikolin V, Milicevic V, Radosavljevic V. (2008). Presence of bovine herpesvirus type 4 (BHV-4) infections in bulls for artificial insemination in Serbia. *Acta VetBeograd*; 58:267-73.
53. OIE, World organization for animal health - Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals - Part 2, section 2.3, chapter 2.3.5 - Infectious bovine rhinotracheitis/infectious pustular vulvovaginitis. 5th edition, 2008. Disponible en http://www.oie.int/fr/normes/mmanual/a_00056.htm, fecha de consulta 04/03/17.
54. Pastoret, P.P.; Aguilar-Setien, A.; Burtonboy, G.; Mager, J.; Jetteur, P.; Schoenaers, F. (1979) Effect of repeated treatment with dexamethasone on the reexcretion pattern of infectious bovine rhinotracheitis virus and humoral immune response. *Vet. Microbiol.*, 4:149-159.
55. Pico, M. C. B.; Giralдино, I. G. F, Otero, A. G. (1997). *Inmunología Experimental*. (Ed) Félix Varela. *Inmunoensayos Enzimáticos*. (5) 199 - 225.
56. Puntel, M., Fondevila, N. A., Viera, J. B., O'Donnell, V. K., Marcovecchio, J. F., Carrillo, B. J., Schudel, A. A. (1999), Serological Survey of Viral Antibodies in Llamas (*Lama glama*) in Argentina. *Journal of Veterinary Medicine, Series B*, 46: 157–162.
57. Smith, G.A.; Gross, S.P.; Enquist, L.W. (2001) Herpesviruses use bidirectional fast-axonal transport to spread in sensory neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 98:3466-3470.
58. Thiry E., Bublot M., Dubuisson J., Pastoret PP. (1989). Bovine Herpesvirus-4 (BHV-4) Infections of Cattle. En: Wittmann G. (eds) *Herpesvirus Diseases of Cattle, Horses, and Pigs*. *Developments in Vet. Virol.*, vol 9. Springer, Boston, MA., pag: 96 – 115.
59. Thiry, E.; Saliki, J.; Bublot, M.; Pastoret, P.P. (1987) Reactivation of infectious bovine rhinotracheitis virus by transport. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.*, 10(1):59-63.
60. Thiry E, Dubuisson J, Bublot M, Van Bresse MF, Pastoret PP., (1990). The biology of bovine herpesvirus-4 infection of cattle. *DtschTierarztlWochenschr* 97:72–77.
61. Uruguay XXI – Sector Agronegocios – Parte 2, sección 2.3, capítulo 2.3.1 – Ganadería Bovina. Edición junio 2015. Disponible en <http://www.uruguayxxi.gub.uy/informacion/wp-content/uploads/sites/9/2015/06/Informe>, fecha de consulta 16/11/17.
62. Verna A.E., Leunda M.R., Louge Uriarte E.L, Lomónaco M., Pereyra S.B., Odeón A.C. (2008). Primera evidencia virológica de Herpesvirus bovino tipo 4 (BoHV-4) en Argentina. *Rev Argent Microbiol* 40(1): 53 – 55.
63. Verna, A. E.; Manrique, J. M.; Pérez. J.; Leunda, M.; Pereyra, S. B.; Jones, L. R.; Odeón, A. C.; (2012). Genomic analysis of bovine herpesvirus type 4

- (BoHV-4) from Argentina: High genetic variability and novel phylogenetic groups, *Vet Microbiol.* 160:1-8.
64. Wellenberg, G.J.; Mars, M.H.; Van Oirschot, J. (2001) Antibodies against bovine herpesvirus (BHV) 5 may be differentiated from antibodies against BHV1 in a BHV1 glycoprotein E blocking ELISA. *Vet. Microbiol.* 78(1):79–84.
65. Wellemans, G.; Van Opdenbosch, E.; Mammerickx, M. (1986). Experimental inoculation of bovine herpesvirus 4 (strain LVR 140) in pregnant and non-pregnant cows. *Ann. Rech. Vet.* 17: 89–94.
66. Yilmaz, V.; Coskun, N.; Sahin, M. (2015). Molecular detection of Bovine Herpes Virus-1 (BoHV-1), Bovine Herpes Virus-4 (BoHV-4) and Bovine Viral Diarrhoea Virus (BVDV) in aborted ruminant fetuses from Kars province in Northeast Turkey. *Indian J. Anim. Res.*, 50 (4): 551-556. genetic groups. *VetMicrobiol* 160: 1–8.
67. Zimmermann W, Broll H, Ehlers B, Buhk H, Rosenthal A, Goltz M. (2001). Genome sequence of bovine herpesvirus-4, a bovine Rhadinovirus, and identification of an origin of DNA replication. *J Virol.* 75:1186-94.

11 – ANEXO

Planilla de resultados

CARAVANA	TUBO	BOHV1	DVB	BOHV4	nPCR
3193	1	1	1	1	.
861	2	1	1	1	0
4862	3	1	1	1	1
4674	4	1	1	0	1
417	5	1	0	1	.
3542	6	1	0	1	1
3448	7	1	0	1	.
5758	8	1	1	1	.
1965	9	1	0	1	.
1211	10	1	0	1	.
4322	11	1	0	0	0
2042	12	0	0	1	1
5949	14	1	1	1	.
3373	15	1	1	1	1
5092	16	1	1	0	0
4024	17	1	1	1	.

3982	18	1	1	1	.
6143	19	1	0	1	.
4851	20	1	0	0	.
5189	21	1	0	1	1
852	22	1	0	1	.
4649	23	1	0	0	.
4140	24	1	1	1	.
279	25	1	1	1	1
2053	26	1	0	1	.
1903	27	1	0	1	1
4325	28	1	0	1	.
2049	29	1	0	1	0
4401	41	1	0	1	.
836	42	1	1	1	1
4324	43	1	0	1	1
3684	44	1	0	1	.
1761	45	1	0	1	.
4005	47	1	0	1	.
5262	48	0	0	1	.

4274	49	1	0	1	.
5028	50	.	.	.	1
4404	53	1	0	1	.
5269	54	0	0	1	.
1808	55	1	1	1	1
820	56	1	0	1	.
913	57	1	0	1	1
821	58	0	1	1	.
819	59	1	0	1	.
3984	46b	1	1	1	.
4859	60	1	1	1	.
4851	61	1	0	0	.

Para la realización de este trabajo se consideraron solamente 47 muestras.